

ラット脳幹内顔面神経膝部軸索損傷モデルにおける 顔面神経核の逆行性変性機構の抑制に関する研究

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳機能制御学
(旧講座名: 脳神経外科学)
(主任: 山下純宏教授)

増 谷 剛

本研究の目的は、成熟ラット顔面神経核の逆行性変性モデルを確立し、軸索損傷部位の違いによる神経細胞の変性、脱落とグリア細胞の反応を経時的に比較検討することで逆行性変性の機構の詳細をさぐり、さらに自家坐骨神経移植による神経細胞保護効果の可能性を検討することである。顔面神経軸索を茎乳突起出口部で切断した末梢損傷モデル、同部位で引き抜き末梢モデルより神経核側で損傷を加えた引き抜き損傷モデル、定位脳的に脳幹内顔面神経膝部を切断した脳幹内損傷モデル、脳幹内軸索損傷後ただちに自家坐骨神経を取り出し損傷部位に移植した坐骨神経移植モデルを作製し、神経細胞の変化と生存率、周辺のグリア細胞の反応を免疫組織化学的に検討した。術後7日目、28日目いずれにおいても各モデル間にグリア線維性酸性蛋白 (glial fibrillary acid protein, GFAP) 陽性アストロサイトの発現に差は認められなかった。ED1陽性マクログリアおよびマクローファージは術後7日目、28日目では引き抜き損傷群、脳幹内損傷群の顔面神経核周囲に発現の上昇がみられた。術後7日目における顔面神経細胞生存率は末梢損傷群で $102.4 \pm 5.2\%$ 、引き抜き損傷群で $94.6 \pm 7.4\%$ であるのに対し脳幹内損傷群では $30.9 \pm 8.3\%$ で、脳幹内軸索損傷により有意に低下した ($p < 0.01$)。移植群で $43.7 \pm 6.2\%$ と脳幹内損傷群よりも有意に細胞死が抑制された ($p < 0.01$)。術後28日目では、末梢損傷群で $90.2 \pm 3.0\%$ であるのに対し、引き抜き損傷群で $49.7 \pm 6.2\%$ 、脳幹内損傷群で $2.3 \pm 1.2\%$ と有意に生存率が低下した ($p < 0.01$)。移植群の生存率は $20.4 \pm 5.1\%$ と逆行性変性は有意に抑制された ($p < 0.01$)。以上より、顔面神経軸索損傷後の神経細胞の生存には、神経核周囲のグリアの関与は軽微で、損傷部位よりも末梢に存在するシュワン細胞が脳幹内の損傷においても神経細胞死の抑制に大きく関与していることが示唆された。

Key words axotomy, facial nerve, neurotrophic factors, retrograde degeneration, transplantation

顔面神経軸索の髄鞘はObersteiner-Redlich zoneより中枢側では乏突起膠細胞、末梢側はシュワン細胞によって構成される¹⁾。錐体骨内損傷やベル麻痺などの末梢性顔面神経軸索損傷は神経軸索再生現象に伴い機能回復が期待できるのに対し、中枢側での軸索損傷は軸索の再生が抑制されることより、臨床的に永久的な機能障害が残る²⁾。中枢側での軸索損傷は、脳幹部腫瘍や第4脳室内腫瘍の脳幹内伸展、外傷による瀰漫性軸索損傷、血管障害などによる脳幹内顔面神経障害、さらには聴神経腫瘍などの小脳橋角部腫瘍による脳幹橋延髄移行部から脳幹をでた直後の顔面神経根起始部での軸索損傷によって生じる可能性がある。損傷後の機能温存ならびに機能回復には神経細胞が生存し続けることがその後の軸索再生への絶対条件であるが、逆行性変性 (retrograde degeneration) により、損傷後に徐々に顔面神経細胞核の神経細胞脱落が起こることが知られている^{3,4)}。一般的に、神経細胞の生存に関わる因子として、神経細胞の種類、種の年齢、損傷部位から神経細胞までの距離等に左右されることが報告されている⁵⁾。顔面神経核では、神経細胞の逆行性変性の程度は、種によって相

違があり、マウスの逆行性変性はラットと比較して顕著であること^{6,7)}、同一種においても週齢により異なった反応をみせ、幼若動物では成熟動物に比べ変性を起こしやすいことなどが知られている⁸⁻¹⁰⁾。最近になって末梢部位の損傷が、中枢側、すなわち内耳道内や脳幹周辺であるほど、損傷後の顔面神経の生存率は低いこと^{11,12)}が報告された。顔面神経を含めた軸索切断後の逆行性変性によって生じる神経細胞死のメカニズムの詳細はいまだ不明であるが、アポトーシスの関与が取りざたされるようになり¹³⁻¹⁵⁾、これらはニューロトロフィン、サイトカイン、成長因子などの各種神経栄養因子の欠落に起因する可能性が示唆されている^{16,17)}。顔面神経軸索切断後、損傷部位より末梢のシュワン細胞が放出する神経栄養因子が神経細胞死を抑制するとする報告があるが¹⁸⁻²⁰⁾シュワン細胞移植による顔面神経保護効果を検討した報告はない。

本研究では成熟ラットを用い、3群の顔面神経軸索損傷モデルを作製し顔面神経細胞の変性の過程を検討した。末梢損傷モデルとして、茎乳突起出口部で顔面神経軸索を切断し、損傷部位の近位端にクリップをかけることで再生を完全抑制した群、

平成14年11月20日受付、平成15年1月17日受理

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CNTF, ciliary neurotrophic factor; GDNF, glial cell derived neurotrophic factor; GFAP, glial fibrillary acid protein; PFA, paraformaldehyde; NGF, nerve growth factor

中枢側に近位の損傷モデルとして茎乳突孔出口部で露出した顔面神経本幹を引き抜きより中枢側で損傷を加えた引き抜き損傷モデル、脳幹内で定位脳的に顔面神経膝部の軸索をマイクロメスで切断した脳幹内損傷モデルを作製し、それぞれが引き起こす損傷部位の違いによる逆行性顔面神経細胞変性を比較検討するために、神経細胞生存率、神経細胞周囲の非神経細胞の反応について検討した。さらに、シュワン細胞による神経細胞死抑制効果の有無を検討するために顔面神経膝部切断後、直ちに自家坐骨神経組織を移植した坐骨神経移植モデルを作製し、坐骨神経組織による神経細胞に対する保護効果についても併せて検討した。

対象および方法

I. 実験動物

実験動物として体重250gから300gの雄性ウィスターラット46匹を用いた。実験モデルは末梢損傷群、引き抜き損傷群、脳幹損傷群、移植群として、手術後7日目および28日目をそれぞれ各5匹ずつ作製した。また脳幹内顔面神経軸索損傷を含まないように脳幹損傷を加えた群をコントロールモデル群として手術後7日目および28日目をそれぞれ3匹ずつ作製した(各モデルの詳細はII参照)。実験動物の使用は金沢大学宝町地区実験指針に従った。ラットはステンレスゲージに1匹ずつ入れ、実

験時以外は水と餌を自由に摂取できるようにした。手術および標本摘出はすべて5%抱水クロラール(0.01ml/g)の腹腔内投与による麻酔下に行った。また、手術に使用した手術器具は70%エチルアルコールにて消毒した。ラットの皮膚はポビドンヨードにて消毒した。

II. 実験モデルおよび標本の作製

1. 末梢損傷モデル

剃毛後、耳介の後下方に約2cmの皮膚切開を加え、茎乳突孔より末梢の顔面神経本幹を露出し、後耳介神経分岐直前の部位で切断した。軸索再生を防ぐために神経を約5mm切除、摘出し、さらに残存した中枢側の顔面神経遠位端にはクリップ(Zen clip)をかけた(計10匹)。

2. 引き抜き損傷モデル

1と同様に顔面神経本幹を露出し、周囲結合組織を剥離したのちにマイクロ摂子で顔面神経を把持し末梢側へ引き抜いた。この操作により、茎乳突孔より中枢側約1cmの部位での顔面神経軸索損傷モデルが作製された(計10匹)。

3. 脳幹損傷モデル

頭頂部を剃毛後、ラットを定位脳装置に固定した。頭頂部正中に約4cmの皮膚切開を加え前方はプレグマ、後方は大孔まで露出した。直径5mmの鋼製ドリルで横静脈洞を避けて右後頭骨に7mm×20mmの骨窓を開けた。脳幹内の顔面神経膝部は

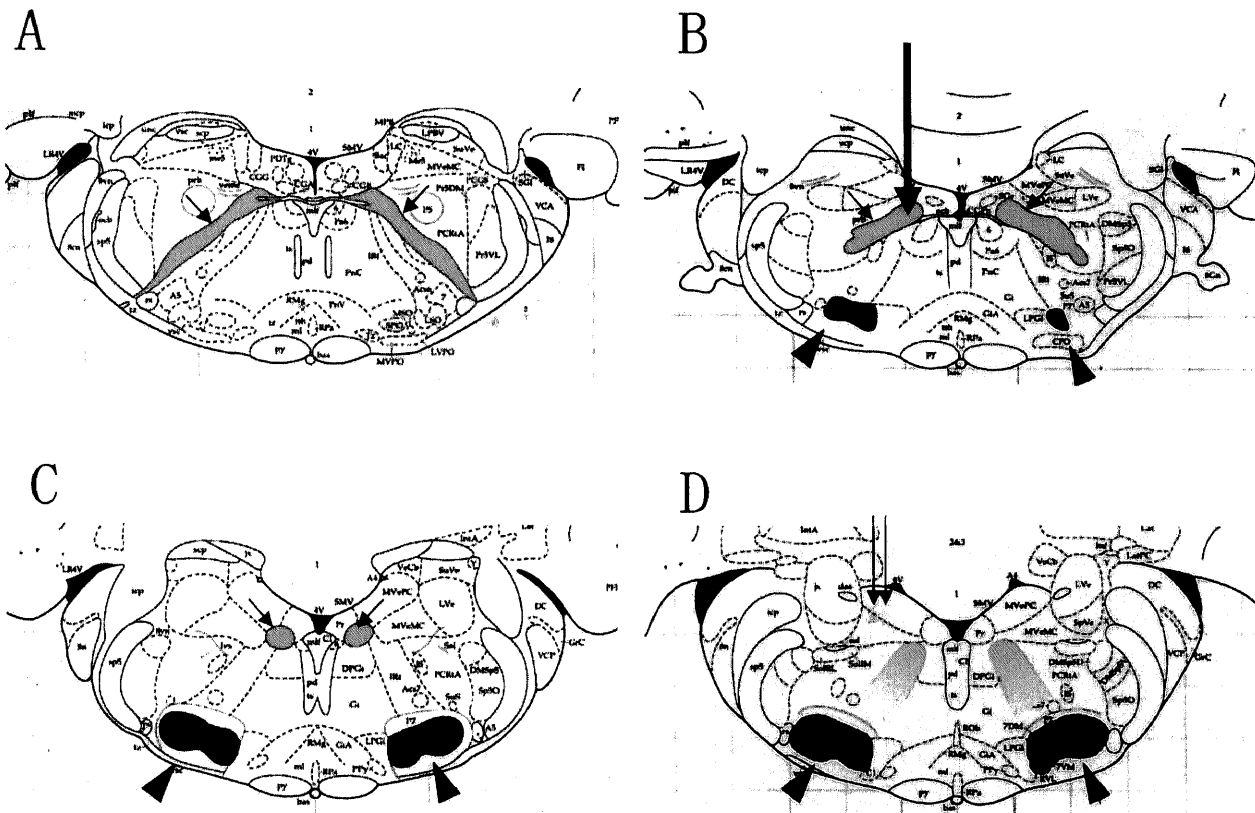


Fig. 1. The anatomical scheme of rat brainstem (modified from The rat brain in stereotaxic coordinates by Paxinos 1982) at levels including facial nuclei (facial nuclei are indicated by arrowheads in B-D) and facial nerve tracts (facial nerve tract is indicated by small arrows in A-C). A; 10.04mm, B; 10.30mm, C; 10.80mm, and D; 11.30mm caudal from the bregma horizontally. The large arrow in figure 1B indicates the direction and the lesion, where the facial nerve tract is stereotactically transected about 10mm caudal from the bregma. The double arrows in figure D indicate the injury site in the control injury model, which is 11.30mm caudal from the bregma.

ブレグマから尾側に10mm, 腹側に8mm, 正中から1mm外側に存在する(図1)²¹⁾. マイクロメスを水平から45度下方の角度に固定し脳内に入ることにより, 横静脈洞の損傷を避け, 経小脳の脳幹内顔面神経軸索膝部で顔面神経が切断された. 具体的にはマイクロメスを45度前下方に傾けて固定し, 先端をブレグマに合わせ, 外側に1mm, 後方に1.5mm, 下方に13.5mm移動した点を切断開始点とした. そこから前方に1mm, 上方に1mmずつ, それぞれ交互に合計5mmずつマイクロメスを移動することで脳幹内顔面神経軸索を切断し得た. 完全顔面神経軸索切断がえられたことは, 麻酔覚醒後手術翌日まで損傷側の頬髭に全く動きが見られないことで確認できた(計10匹). また, 術後より一定期間後の灌流固定までの間にわずかも損傷側の頬髭に動きが見られた場合には, 不完全損傷として実験の対象より除外した.

4. 坐骨神経移植モデル

右下肢から長さ10mmの坐骨神経を摘出した. 摘出した坐骨神経は, 直ちに滅菌PBS内に浸し, その中で神経外膜を剥離し移植に備えた. 脳幹内顔面神経軸索損傷後, 自家移植坐骨神経を18ゲージの八光針の外筒の中に入れ, 定位脳装置を使用して前述の切断開始点から2mm深部の点に向かって3分間で徐々に挿入した(計10匹).

5. コントロールモデル

損傷作製操作が直接顔面神経核へ及ぼす影響を除外するため顔面神経軸索および顔面神経核には直接損傷のない脳幹損傷モデルをコントロールモデルとして作製した. 損傷部位は上記

の開始点より外側に1mm, 尾側に1.5mmの部位で, 損傷部位は上記の損傷より顔面神経核に解剖学的にはより近い位置, すなわち前庭神経外側核に損傷を加えた(計6匹).

6. 固定

各群ともに, 手術後7日目および28日目に抱水クロラル麻酔下に開胸し, 左心室より灌流固定を行った(各5匹, コントロール群は各3匹). 灌流液には10倍希釈PBS (0.1×PBS) (pH7.4) に溶解した4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) 溶液を用いた. 灌流固定後, 断頭し, 4% PFA-PBS中に浸し, 4℃にて24時間浸透させた後に顕微鏡下に脳を取り出した. 顔面神経核および脳幹内顔面神経軸索を含むように下丘下端から門の間の脳幹を摘出し, 脱水処理の後パラフィンに包埋した. 顔面神経核を含む部分を20μmの厚さで薄切し, 連続切片を作製した. 生存細胞数の計測には20μmの切片を7スライスごと選択し, 通常10から11枚の切片を用いた. また一部5μmの切片を作製し, 病理組織学および免疫組織化学的検討に用いた.

Ⅲ. 病理組織学的検討

顔面神経核を含む厚さ5μmの組織切片をキシレン(和光純薬, 大阪)で脱パラフィン後, HE染色を行い, 光学顕微鏡で観察した.

Ⅳ. 免疫組織学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidine-biotin-peroxidase complex) 法にて行った. キシレン(和光純薬)を用いて厚さ5μmの組織切片を脱パラフィン後,

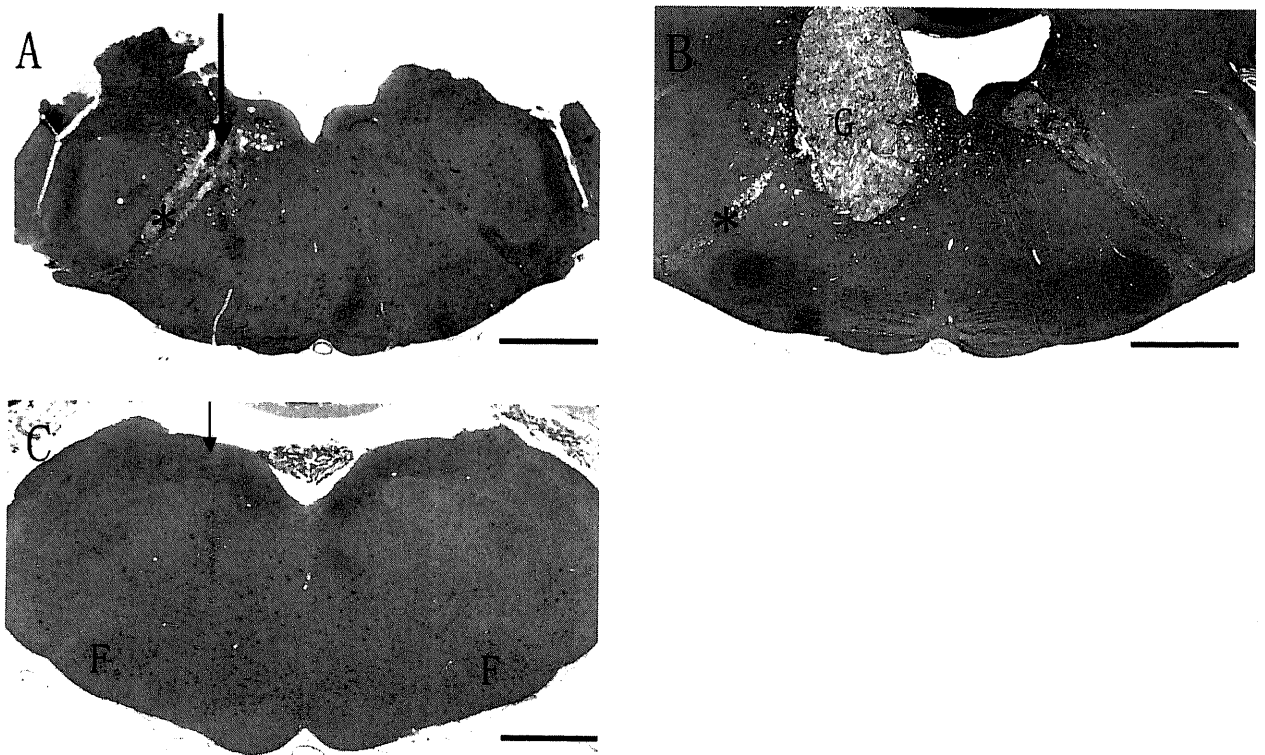


Fig. 2. Light micrographs demonstrating morphological changes in the brainstem injury model, the transplanted model, and the control injury model. (A) In the brainstem injury model on day 7, right facial nerve is cut at the genu (arrow) of the facial nerve and the distal segment of the facial nerve tract is degenerated (asterisk). (B) In the transplanted model on day 28, the transplanted sciatic nerve is well survived (G) without any response of rejection. (C) In the control injury model, the injury site of sham operation (small arrow), and intact facial nuclei (F) are seen. HE staining. Scale bars, 20mm.

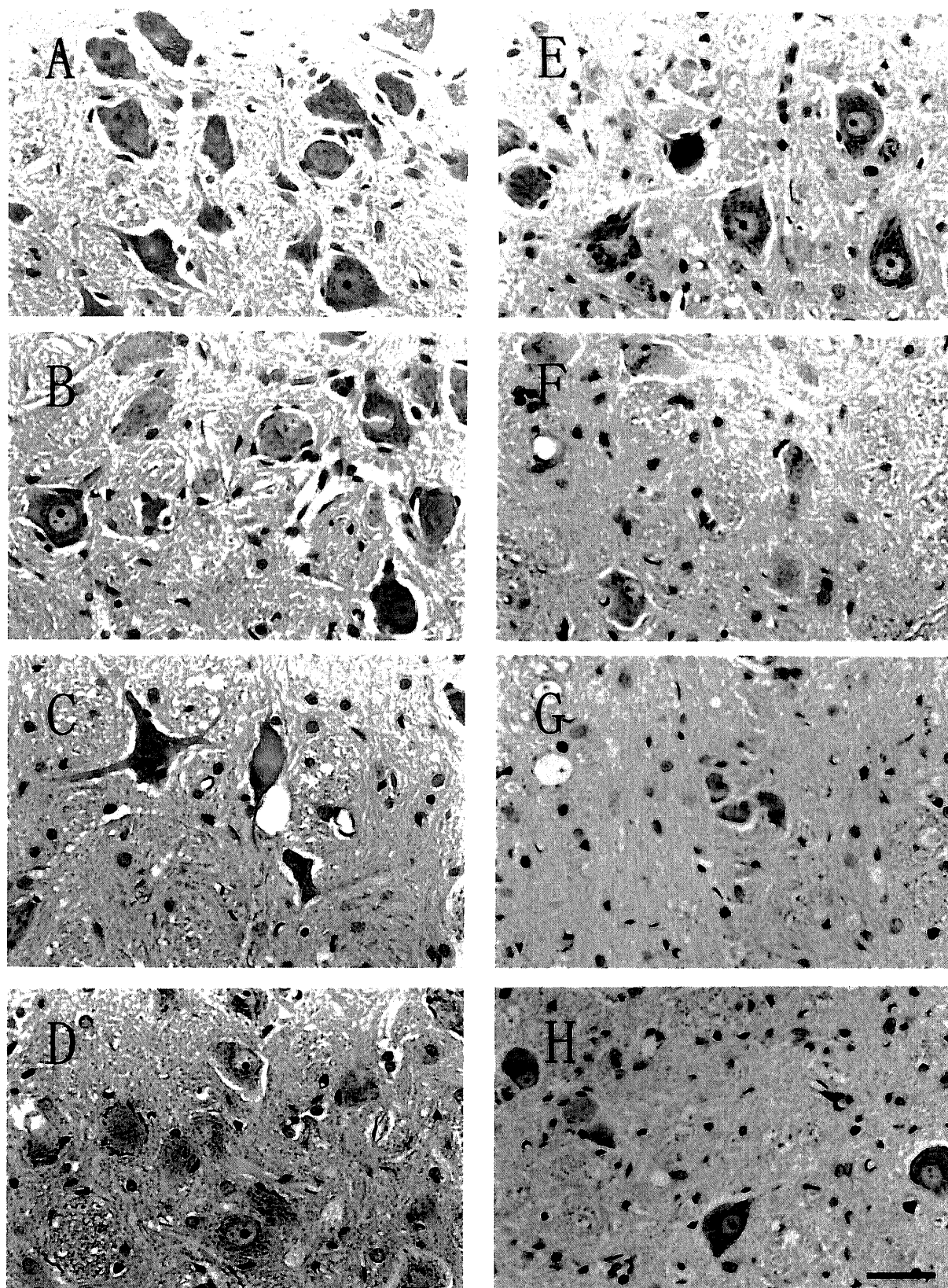


Fig. 3. Light photographs showing the morphological changes of the facial nuclei following different types of axotomy (A, E; distal injury model, B, F; proximal injury model, C, G; brainstem injury model, D, H; transplanted model) on day 7 (A-D) and day 28 (E-H). Some neurons show decentralized nuclei in the distal injury model (A) and the proximal injury model (B) on day 7. Degenerative neurons are present in the brainstem injury model (C) and the transplanted model (D) on day 7. On day 28, both neurons of regular and degenerative morphology are present in the distal injury model (E) and the proximal injury model (F). Most of the facial motoneurons in the brainstem injury model (G) and the transplanted model (H) show atrophic feature. HE staining. Scale bar, 40 μ m.

連続希釈のエタノールにて親水し、PBS (pH7.4) で洗浄し、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBSで洗浄後、一次抗体として抗グリア線維性酸性蛋白抗体 (300倍希釈) (glial fibrillary acid protein, GFAP) (DAKO, Glostrup, Denmark), 抗ED1抗体 (250倍希釈) (Serotec, Oxford, UK) を室温で10分間反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (DAKO) を10分間反応させた。各反応後にPBS (pH7.4) で洗浄し、発色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン (Sigma, St.Louis, USA) 処置にて行った。

V. 生存細胞数のカウント

生存細胞数の評価にはニッスル染色を行った。厚さ20 μ mの組織切片をキシレンで脱パラフィン後、100%エタノールに2回通し、100%エタノールに浸透し2時間室温で放置した。その後、2%クレシルエヒトバイオレット溶液 (Sigma) 2ml, 0.4gの酢酸ナトリウム、ならびに0.6mlの水酢酸を200mlの蒸留水に溶解した混合液中で45分間反応させ、エタノールで脱水し、キシレンで透徹した。エンテランにて封入後、顕微鏡下に、20倍の拡大率で組織写真を撮影し、コンピューターに取り込んだ。生存神経細胞のカウントはHottinger⁷⁾, Dai¹²⁾の方法に基づいて行った。顔面神経細胞以外のグリア系細胞、すなわちアストロサイトやマイクログリアをカウントしないように直径20 μ m以下の細胞は除外し、クレシルエヒトバイオレット染色によって核と核小体が明染されるもののみをカウントした。健

常側の細胞数に対する損傷側の生存細胞数の比率を神経細胞生存率とした。

VI. 統計学的検討

測定値は全て平均±標準偏差で示した。多群間の評価にまず一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) をおこなった。その後、Turkey-Kramer法を用い2群間の比較をおこなった。危険率1%未満 ($p<0.01$) をもって統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. 脳幹内損傷モデル、坐骨神経移植モデルの作製

再現性を持って定位的に脳幹内顔面神経膝部を切断し得た (図2A)。損傷部位よりも末梢の脳幹内顔面神経軸索はワーラー変性に陥った (図2A)。また、脳幹内顔面神経軸索損傷部位に坐骨神経組織を移植することができた (図2B)。顔面神経軸索および顔面神経核に直接損傷のない脳幹損傷モデルを作製することができた (図2C)。

II. HE染色

手術後7日目では、末梢損傷群では核の偏在する顔面神経細胞が少数に認められた (図3A)。引き抜き損傷群では核は偏在し、薄く塩基性に染色される顔面神経細胞が顕視野で2個程度の頻度で散見された (図3B)。脳幹損傷群では核の溶解が既に見られ、すでに69.1%の顔面神経細胞が変性、脱落していた (図3C)。移植群では脳幹損傷群よりは核の形態が保たれていたものの、56.3%の顔面神経細胞が変性、脱落していた

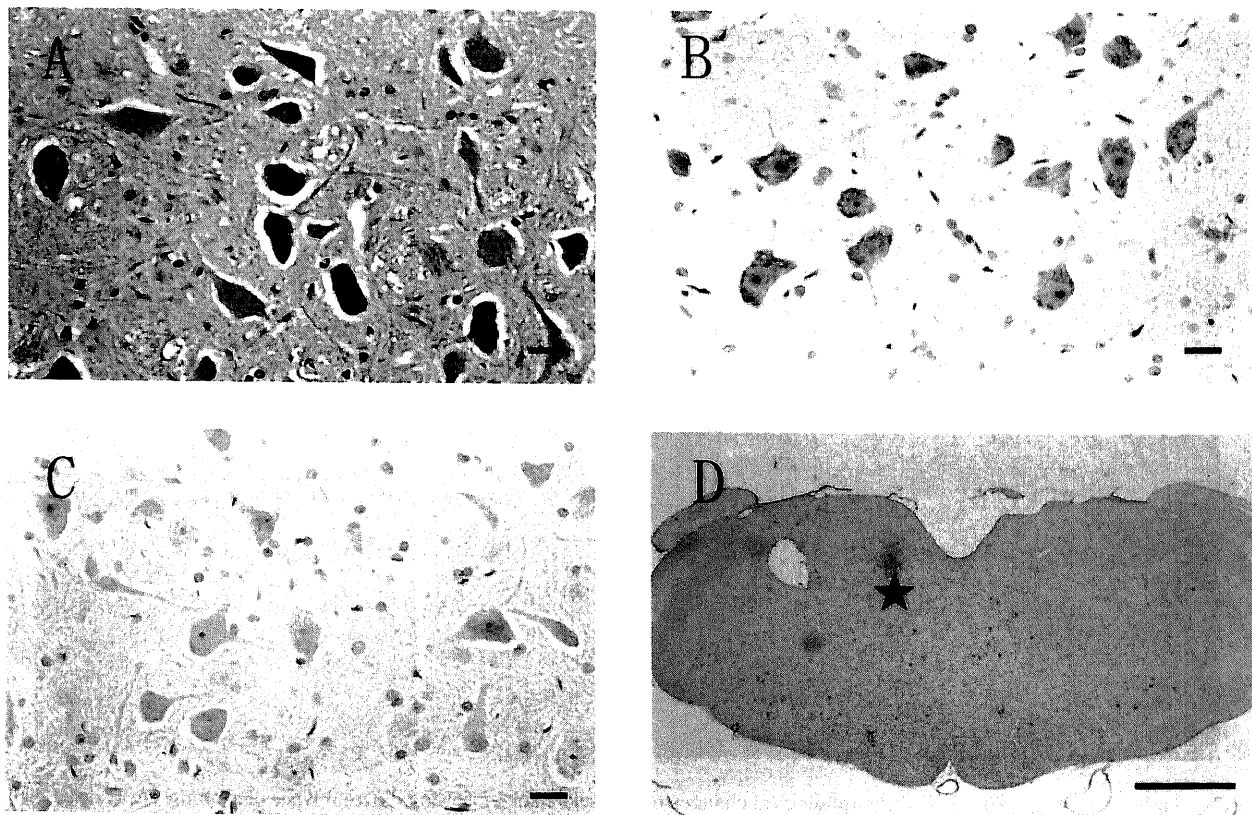


Fig. 4. Photographs showing morphological changes of the control injury model on day 7, including HE staining (A), immunohistochemical study of GFAP (B) and ED1 (C) (D). (A) No damage caused by the injury is seen in the facial nuclei. (B, C) There is no increase in GFAP or ED1 immunoreactivity around the facial nuclei. (D) ED1 immunoreactivity is seen only at the site of the injury (asterisk). Scale bars, 40 μ m (A-C), 20mm (D).

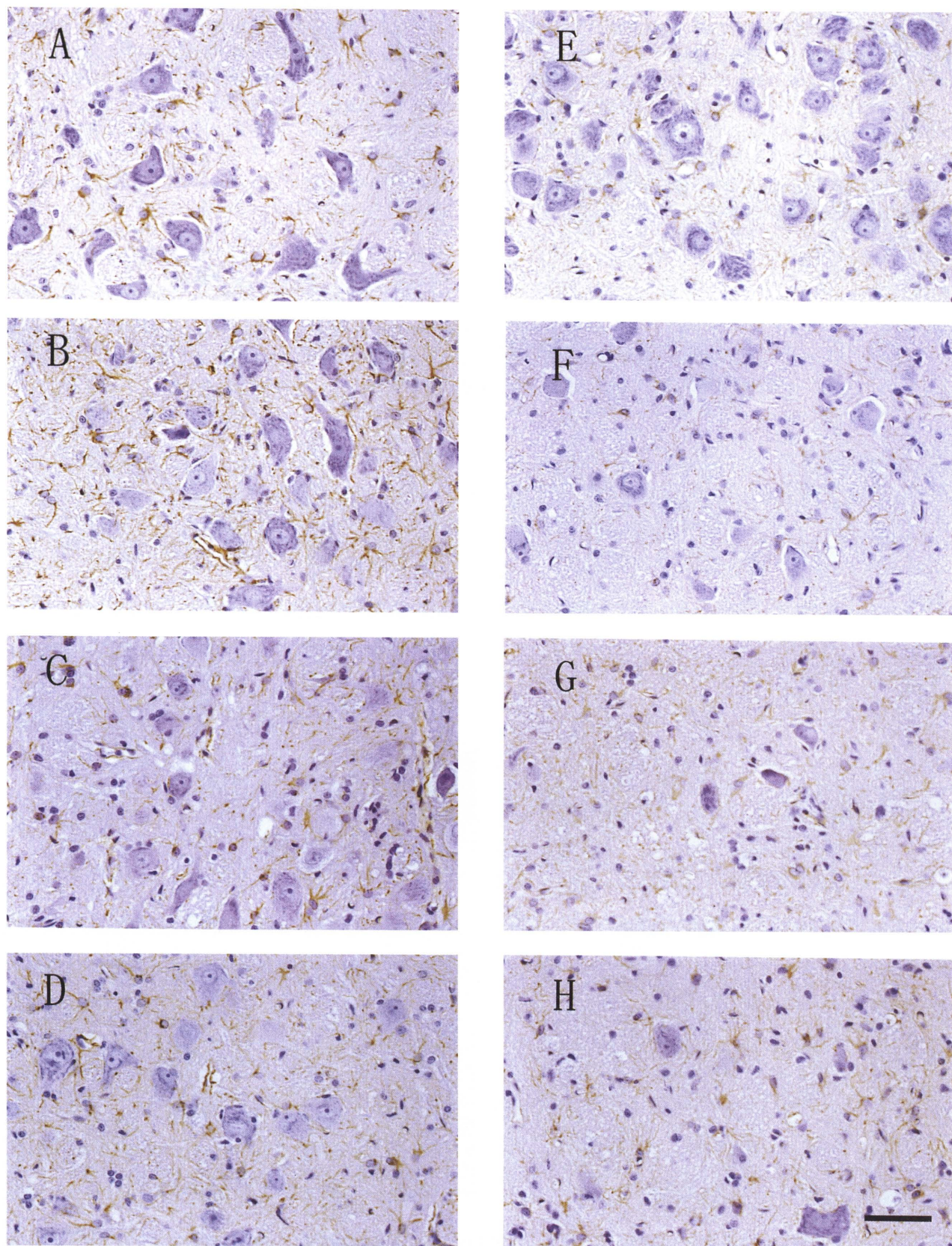


Fig. 5. Immunostaining for GFAP in the distal injury model (A, E), the proximal injury model (B, F), the brainstem injury model (C, G) and the transplanted model (D, H). GFAP immunoreactivity is increased in the all models on day 7 (A-D) and it decreases but presents yet on day 28 (E-H). Scale bar, 50 μ m.

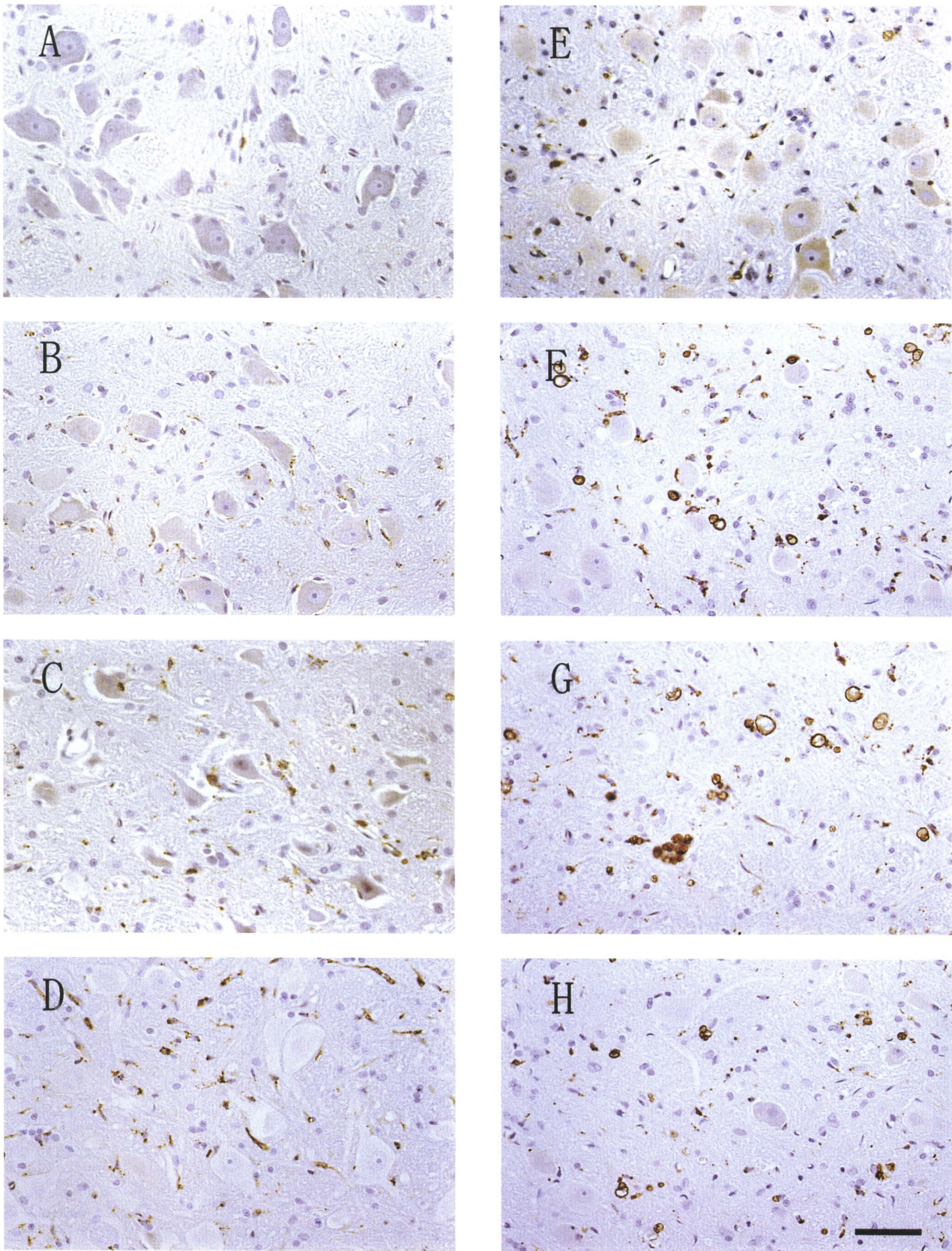


Fig. 6. Immunostaining for ED1 in the facial nucleus of the each model on day 7 (A-D) and on day 28 (E-H). Some immunoreactivity is found in the distal injury model (A, E). Increase of ED1 immunoreactivity is seen in the proximal injury model (B, F), the brainstem injury model (C, G) and the transplanted model (D, H), and it becomes evident in the each model on day 28. Scale bar, 50 μ m.

(図3D)。損傷部位に認められる出血はいずれの群においても核周辺にまでは及んでおらず、健常側の核には変性の所見は全く認められなかった。

手術後28日目では、末梢損傷群では9.8%の顔面神経細胞が脱落した(図3E)。引き抜き損傷群ではさらに染色性が希薄になり、50.3%の顔面神経細胞で変性、脱落がみられた(図3F)。脳幹内損傷群ではほとんど生存細胞が認められず、凝縮した細胞のみが散見されるにとどまった(図3G)。移植群では20.4%の顔面神経細胞が生存していた(図3H)。健常側の核には変性の所見は認められなかった。

手術後7日目では、コントロール群では損傷側の顔面神経核に変性、脱落の所見は全く認められず(図4A)、手術後28日目

でも7日目と同様、核とその周辺に変性の所見は認められなかった。

Ⅲ. 免疫組織化学

手術後7日目、28日目において、コントロール群では顔面神経核周辺にGFAP陽性アストロサイトの発現(図4B)、ED1陽性マクログリアの発現(図4C, D)は認めなかった。その他の群ではGFAP陽性アストロサイトの過剰発現が認められたが、その程度は各群間で差異は無く、手術後28日目(図5E-H)では7日目(図5A-D)に比べると発現の程度が低下した。ED1陽性マクログリアは手術後7日目ではコントロール群以外のすべての群でその発現を認めたが、末梢損傷群ではその出現はごくわずかであり(図6A)、引き抜き損傷群(図6B)、脳幹内損傷群

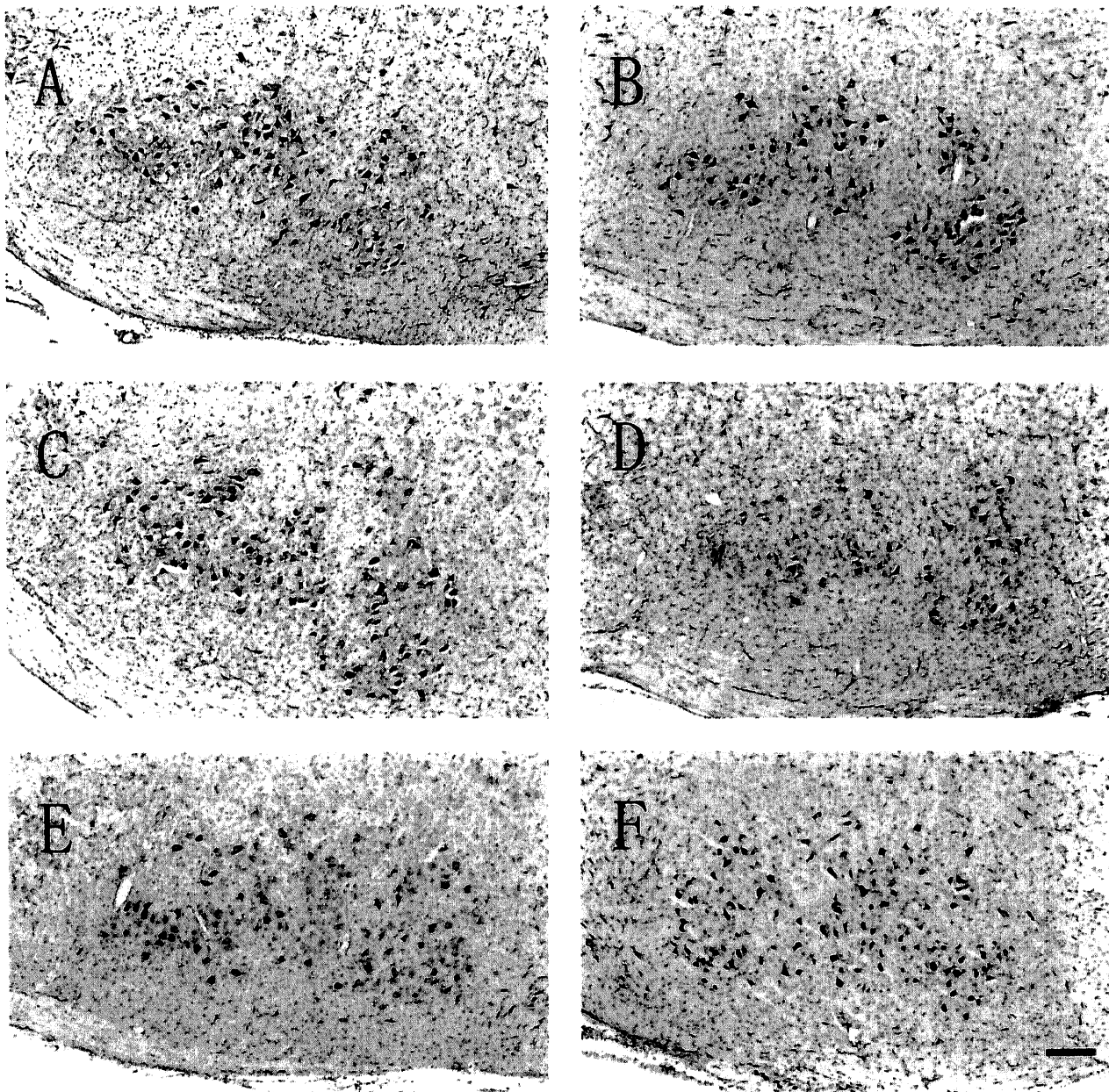


Fig. 7. Light micrographs with Cresyl violet staining of the brainstem at the level of 11.30mm caudal from the bregma. (A; control injury model, B; distal injury model, C; proximal injury model, D; brainstem injury model, E; transplanted model on day 7. F; normal control.) Almost all motoneurons survive in the distal injury model (B) and the proximal injury model (C). Some motoneurons fall into degeneration in the brainstem injury model (D) and the transplanted model (E). Scale bars indicate 0.1mm.

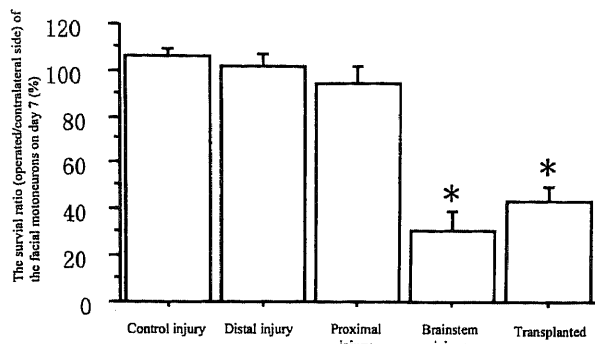


Fig. 8. Graph showing the survival ratio (operated/contralateral side) of the facial motoneurons on day 7. Data are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.01$ indicates a significant difference.

(図6C), 移植群 (図6D) はほぼ同程度に認められた. ED1陽性マクログリアは各々のモデルでその程度が上昇し, その中でも引き抜きモデル (図6F), 脳幹モデル (図6G), 移植モデル (図6H) では顕著であった.

Ⅳ. 顔面神経細胞生存率

手術後7日目での健常側に対する顔面神経細胞生存率は, コントロール群 ($n=3$) で $105.8 \pm 3.8\%$, 末梢損傷群 ($n=5$) で $102.4 \pm 5.2\%$, 引き抜き損傷群 ($n=5$) で $94.6 \pm 7.4\%$, 脳幹内損傷群 ($n=5$) で $30.9 \pm 8.3\%$, 移植群で $43.7 \pm 6.2\%$ であった (図7). 脳幹内損傷群, 移植群は他の3つの群に対して有意差をもって神経細胞生存率が低下した ($p < 0.01$) (図8). 手術後28日目での顔面神経細胞生存率は, コントロール群で $96.4 \pm 5.0\%$, 末梢損傷群で $90.2 \pm 3.0\%$, 引き抜き損傷群で $49.7 \pm 6.3\%$, 脳幹内損傷群で $2.3 \pm 1.2\%$, 移植群で $20.4 \pm 5.1\%$ であった (図9). 引き抜き損傷群, 脳幹内損傷群, 移植群は他の2つのモデルに

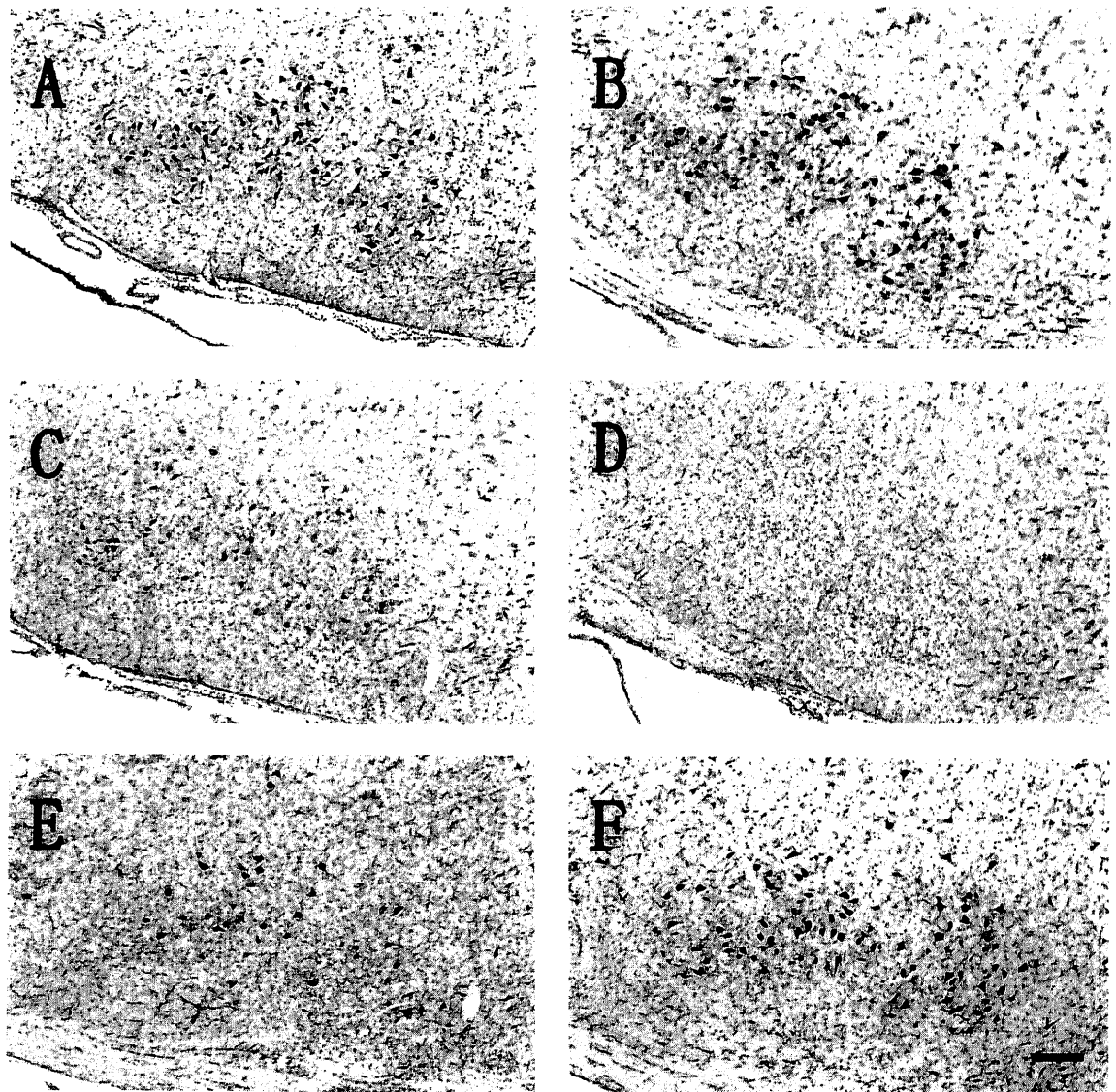


Fig. 9. Light micrographs with Cresyl violet staining of the rat brainstem at the level of 11.30mm caudal from the bregma. (A; control injury model, B; distal injury model, C; proximal injury model, D; brainstem injury model, E; transplanted model on day 28. F; normal control.) Almost all motoneurons survive in the distal injury model (B). Half of the motoneurons die in the proximal injury model (C). Almost all motoneurons die in the brainstem injury model (D), but 20% of motoneurons are rescued by the transplanted autogenic sciatic nerve (E). Scale bars indicate 0.1mm.

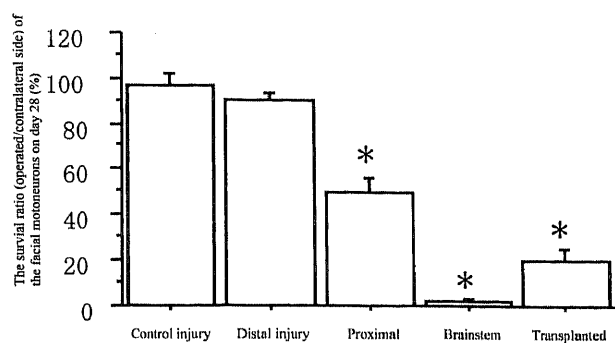


Fig. 10. Graph showing the survival ratio (operated/contralateral side) of the facial motoneurons on day 28. Data are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.01$ indicates a significant differences.

対して有意差をもって神経細胞生存率が低下した ($p < 0.01$) (図10)。また坐骨神経移植操作は、有意差を持って神経細胞生存率を向上させた ($p < 0.01$) (図10)。自家坐骨神経移植操作により、脳幹内軸索損傷手術後28日における神経細胞死による神経脱落を18%減少させることができた。

考 察

1. 本研究の意義

顔面神経運動枝は純粋な運動神経であり、神経核は橋被蓋の腹外側に存在し²²⁾、髄鞘はObersteiner-Redlich zoneより中枢側は乏突起膠細胞、末梢側はシュワン細胞で構成される。末梢側での損傷では軸索が再生し機能回復が期待されるのに対し、中枢側での軸索損傷は軸索が再生されず臨床的に永久的な機能障害が残る。機能回復を目指すためには顔面神経核の逆行性変性を抑制することが絶対条件である。齧歯類では軸索損傷によって引き起こされる逆行性変性の程度は動物の種類^{9,11)}や発達の過程^{10,11,23)}によって異なり、末梢部位の顔面神経軸索を切断するとマウスや幼弱ラットの場合は神経細胞死に至るが、成熟ラットでは神経細胞死に至らず軸索を伸長する。顔面神経軸索損傷後の機能回復を目指し幼弱ラットやマウスの末梢性顔面神経軸索損傷によって引き起こされる神経細胞の逆行性変性を抑制し、神経細胞の温存をはかる様々な研究が報告されている^{8,24)・27)}。中枢側での顔面神経逆行性変性モデルはMattssonら^{11,28,29)}が初めて報告し、成熟ラットの頭蓋内脳幹外顔面神経軸索切断モデルを作製し1ヶ月で約7割の神経細胞が細胞死に至ることを示した。しかし、頭蓋内脳幹外顔面神経軸索切断モデルを作製する手術手技は困難であり、さらに損傷部位に直接組織を移植することや各種神経栄養因子を損傷部位に投与し神経細胞の保護効果を検討することは手技的に困難である。本実験では定位脳装置を用いることで比較的容易に、しかも再現性を持って成熟ラットの脳幹内顔面神経軸索を切断し、顔面神経核の逆行性変性モデルを作製することができた。さらに自家坐骨神経組織を移植し逆行性変性に対する抑制効果を確認できた。つまり脳幹内顔面神経軸索切断後7日目で69.1±8.3%もの神経細胞が変性、脱落し、28日目ではほとんどの神経細胞は脱落したが、損傷部位に坐骨神経組織を移植することで20.4±5.1%の生存率の向上がみられた。本研究における再現性を持った脳幹内顔面神経軸索切断モデルおよび坐骨神経移植モデル

は過去に報告が無く、中枢性顔面神経損傷に対する治療のみならず、中枢神経系の機能温存ならびに機能回復に関する研究をする上での新しい実験モデルとして有用であると思われる。

II. 顔面神経軸索損傷後の神経核周辺のグリア反応について

顔面神経軸索損傷後、細胞体の周辺ではグリアの反応が展開される。神経核周辺のマイクログリアやアストロサイトは軸索損傷部位からは離れた部位に存在しており直接軸索損傷の情報が伝わらない。したがって、損傷運動神経細胞からサイトカインなどの液性因子により損傷情報が伝わると考えられる³⁰⁾。軸索損傷後、3日後にはマイクログリアが損傷神経細胞の周囲に移動し、神経細胞体を包み込むようになる。その後5日から7日後に、アストロサイトにおいて著しいGFAPの発現を伴う突起伸長がみられる^{28)・31)}。マイクログリア、アストロサイトは神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) を含むニューロトロフィンファミリーやサイトカイン、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) を代表とする成長因子群などの神経栄養因子を放出することが知られている³²⁾。しかし、Kallaら³³⁾はマクロファージ刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, MCSF) ノックアウトマウスの顔面神経軸索を損傷しても顔面神経核周辺には、マイクログリアの発現は認められず、コントロールマウスと比較し、神経細胞の生存および細胞死には影響しないことを報告した。またラット顔面神経を乳突孔出口付近で切断し8ヶ月後の神経細胞生存率を調べたAngelovら³⁴⁾は、ニモジピンを与えることで神経核周辺にED1陽性マイクログリアおよびマクロファージの発現上昇がみられたが、コントロールモデルと神経細胞生存率に差異が認められなかったことより、貪食細胞は神経細胞死に関与しないと報告した。一方、Lazalovら^{35)・37)}はワラー変性過程における変性ミエリン除去の際、末梢神経の環境で培養したマクロファージを視神経に移植するとミエリン除去の効率が良好であったことから、中枢神経と末梢神経という環境の違いのために同じマクロファージでも中枢神経領域ではその貪食作用が抑制されている可能性を示唆した。本研究では手術後7日目においては、切断部位が細胞体に近く、神経細胞の変性の程度が激しいモデルほどED1陽性マイクログリアの発現がみられ、GFAP陽性アストロサイトは各モデル間に差異は認められなかった。幼弱ラットと成熟ラットを用いた顔面神経軸索損傷実験でも、逆行性変性が激しい幼弱ラットにED1陽性マイクログリアの発現上昇がみられ、GFAP陽性アストロサイトの発現に関しては差が認められなかったGraeberら⁹⁾の報告と類似した結果となった。以上より、変性顔面神経細胞周辺のグリアが軸索損傷に反応した結果、神経栄養因子を放出したとしてもそれだけでは神経細胞死の抑制効果はほとんど期待できないと考えられた。

III. シュワン細胞による神経保護効果

軸索損傷が神経細胞体に近いほど神経細胞死が起こりやすいことにより、切断部位よりも遠位側に存在する組織が放出するニューロトロフィンやサイトカイン、各種成長因子などの神経栄養因子がなんらかの輸送機構により運搬されることで保護作用を示すと考えられている³⁶⁾。なかでも特に損傷部位よりも末梢に存在するシュワン細胞が放出するNGF、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)、繊毛様神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) の神経保護作用が重要であると考えられている^{39,40)}。末梢神経では

正常な状態では標的組織が産生する神経栄養因子が神経細胞体に逆行性に輸送されるが、軸索が切断されると代わってシュワン細胞がBDNF, NGF, NT-3などのニューロトロフィンや正常シュワン細胞内に蓄積されていたサイトカインであるCNTFを放出し神経細胞体に供給する¹⁷⁾。本実験では手術後28日目において、脳幹内損傷群では96.4±5.0%の神経細胞が脱落したが、坐骨神経を移植することで20.4±5.1%の神経細胞が保護されたこと、損傷部位が引き抜き損傷群よりも約1cm末梢側になると手術後28日後の生存率が49.7±6.3%から90.2±3.0%と約4割も向上することは、神経細胞の保護効果に関してシュワン細胞が重要な役割を果たしていることを直接証明している。

IV. 神経栄養因子による顔面神経核保護作用

顔面神経核の逆行性変性モデルに対する神経栄養因子の効果については、幼弱ラットの末梢性顔面神経切断モデルにおいて、アデノウイルスベクターを用いて神経細胞にBDNF, GDNF, CNTFを発現させ、その神経保護作用を研究した報告があり、その効果はGDNFがもっとも高く約40%の生存率、コントロール群に比べて約4倍の生存率の上昇を得ている²⁴⁾⁴¹⁾。またHottingerら⁷⁾は、成熟マウスを用いて神経栄養因子を発現する期間が長いレンチウイルスベクターによるGDNF発現モデルを作成し、手術後3ヶ月で約50%の生存率を約90%にまで上昇させ、GDNFによる神経細胞保護作用を確認した。シュワン細胞が放出するNGF, BDNF, CNTFなどの神経栄養因子による神経保護作用の重要性が示唆されているが、シュワン細胞移植による神経保護作用については現在のところ報告がない。今回の結果においては手術後28日目では、坐骨神経を移植することで脳幹内損傷において20.4±5.1%の神経細胞を生存させることができ、コントロール群に対して約10倍もの生存率の上昇を確認した。神経細胞の保護にはシュワン細胞移植が大きな効果を示すものであると思われる。しかし、移植した坐骨神経は多様な神経栄養因子を放出するのでより高い生存率が期待されたが、約20%の生存率向上にとどまった理由としては以下のように考えられる。第一に坐骨神経を移植することで損傷が拡大し、周囲のアストロサイトやマイクログリアの反応だけでは確認できない顔面神経核に対する損傷による直接の影響、第二に移植した坐骨神経より放出した神経栄養因子が神経細胞に十分量到達しなかった可能性もあり、今後の検討を要する。さらに中枢神経領域の神経細胞体は軸索損傷後に神経栄養因子に対する感受性が低下するが、末梢神経領域では保たれること、また、この差は細胞体のサイクリックAMPや脱分極の程度による違いによって生じるものであると示唆されている³⁸⁾。中枢神経系では細胞体のサイクリックAMPや脱分極の程度が軸索損傷後において末梢神経系に比べて低くなっており、これらを改善することで生存率を改善させうる可能性があるものと思われる^{42)~44)}。

V. 顔面神経軸索の伸長と機能回復の可能性

中枢神経系では軸索は伸長しないと考えられていたが、Aguiayoら⁴⁵⁾のグループによって、視神経を切断後、末梢神経を移植することで移植片内に網膜神経節細胞から軸索が伸長することが初めて報告された。脊髄においては脊髄を完全横断し一部を摘出した後、末梢神経を束にして移植すると末梢神経を通して軸索が伸長し下肢の運動機能が改善することも報告されている⁴⁶⁾。さらに脳内においては脳弓を一部切断しシュワン細

胞を移植することで、脳弓線維の伸長および髄鞘化に成功したとする報告⁴⁷⁾や小脳に坐骨神経を移植すると深部の小脳顆粒層の細胞から移植片内に軸索が伸長することが確認されている⁴⁸⁾。本研究においても、手術後28日に生存していた顔面神経細胞から移植片内に軸索を伸ばしていく可能性がある。また移植片の遠位端を損傷部位よりもさらに末梢にある顔面神経と吻合することで、長期的には新たな神経回路網を構築させ、機能の回復を目指すことが期待される。

VI. まとめ

中枢性顔面神経麻痺は臨床的に永久的な機能障害が残る。本研究の成熟ラットを用いた脳幹内顔面神経軸索損傷モデルに認められる顔面神経核の逆行性変性、および坐骨神経組織を移植することによってみられる神経細胞変性の抑制効果は、中枢性顔面神経軸索損傷に対する治療のみならず、今後の中枢神経系の機能温存ならびに機能回復に有用な手段であると思われる。

結 論

中枢性顔面神経軸索損傷における機能再生および成熟ラットにおける顔面神経逆行性変性の抑制を目指すために、ラット脳幹内顔面神経軸索損傷モデルを作製し、末梢の顔面神経軸索損傷モデルと細胞の生存率、周囲のグリア細胞の変化について検索し、さらに脳幹内顔面神経軸索損傷部位に同種坐骨神経を移植し、移植片による顔面神経細胞の保護効果を観察し、以下の結果を得た。

1. 顔面神経軸索損傷部位が神経核に近づくにつれて、神経細胞生存率が有意に低下した。手術後28日目において末梢損傷群で9.2%、引き抜き損傷群で50.3%、脳幹内損傷群で97.3%の神経細胞が脱落した。

2. GFAP陽性アストロサイトの発現は各モデル群に差異はなく、ED1陽性マイクログリアの発現は神経細胞の変性、脱落がほとんど認められなかった末梢損傷群より変性、脱落の認められた他の群でより顕著に認められた。

3. 脳幹内損傷部位に自家坐骨神経を移植することにより有意に(p<0.01)顔面神経細胞の生存率が上昇した。

以上の結果より、顔面神経軸索損傷では損傷部位が神経細胞に近いほど生存率は低下し、脳幹内の顔面神経軸索が損傷されるとほとんどの神経細胞は脱落する。この現象は、シュワン細胞が放出する神経栄養因子によって抑制されていると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳機能制御学山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します。また、直接の御指導を賜りました同講座の長谷川光広助教授ならびに実験に御協力頂いた金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻感覚運動病態学の伊藤真人講師に心から感謝致します。また、標本作製に御協力頂いた今村明子文部技官に感謝の意を捧げます。さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳機能制御学の皆様にも深く感謝致します。

本論文の要旨は第13回神経損傷の基礎シンポジウム(2001, 東京)、第25回日本神経科学大会(2002, 東京)において発表した。

文 献

- 1) Sloniewski P, Korejwo G, Zielinski P, Morys J, Krzyzanowski M. Measurements of the Obersteiner-Redlich zone of the vagus nerve and their possible clinical applications.

Folia Morphol (Warsz) 58: 37-41, 1999

2) Choi D, Dunn LT. Facial nerve repair and regeneration: an overview of basic principles for neurosurgeons. *Acta Neurochir (Wien)* 143: 107-114, 2001

3) Rauch FH, Schleicher A, Zilles K. Quantitative analysis of the retrograde reaction of motoneurons with an image analyzer. *Anat Embryol (Berl)* 181: 373-379, 1990

4) Zilles K, Schleicher A, Kretschmann HJ. Automatic morphometric analysis of retrograde changes in the nucleus n. facialis at different ontogenetic stages in the rat. *Cell Tissue Res* 190: 285-299, 1978

5) Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14: 67-116, 1997

6) Ferri CC, Moore FA, Bisby MA. Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 34: 1-9, 1998

7) Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD. Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* 20: 5587-5593, 2000

8) Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hori Y. Deterioration of axotomy-induced neurodegeneration by group IIA secretory phospholipase A2. *Brain Res* 917: 230-234, 2001

9) Graeber MB, Lopez-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S. The microglia/response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813: 241-253, 1998

10) Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol* 23: 1231-1246, 1992

11) Mattsson P, Meijer B, Svensson M. Extensive neuronal cell death following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *Brain Res Bull* 49: 333-341, 1999

12) Dai CF, Kanoh N, Li KY, Wang Z. Study on facial motoneuronal death after proximal or distal facial nerve transection. *Am J Otol* 21: 115-118, 2000

13) de Bilbao F, Dubois-Dauphin M. Time course of axotomy-induced apoptotic cell death in facial motoneurons of neonatal wild type and bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience* 71: 1111-1119, 1996

14) Wang ZM, Dai CF, Kanoh N, Chi FL, Li KY. Apoptosis and expression of BCL-2 in facial motoneurons after facial nerve injury. *Otol Neurotol* 23: 397-404, 2002

15) Lo AC, Houenou LJ, Oppenheim RW. Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention. *Arch Histol Cytol* 58: 139-149, 1995

16) Li L, Oppenheim RW, Lei M, Houenou LJ. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J Neurobiol* 25: 759-766, 1994

17) Li L, Wu W, Lin LF, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9771-9775, 1995

18) Richardson PM. Neurotrophic factors in regeneration.

Curr Opin Neurobiol 1: 401-406, 1991

19) Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25: 101-121, 1996

20) Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-1534, 1989

21) Paxinos GaCW. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney, 1982

22) 東 琢哉. 顔面神経の走行とMRI画像. *Clinical Neuroscience* 18: 14-16, 2000

23) Hall ED, Smith SL, Oostveen JA. Inhibition of lipid peroxidation attenuates axotomy-induced apoptotic degeneration of facial motor neurons in neonatal rats. *J Neurosci Res* 44: 293-299, 1996

24) Gimenez y Ribotta M, Revah F, Pradier L, Loquet I, Mallet J, Privat A. Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 48: 281-285, 1997

25) Tan SA, Deglon N, Zurn AD, Baetge EE, Bamber B, Kato AC, Aebischer P. Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. *Cell Transplant* 5: 577-587, 1996

26) Watabe K, Sakamoto T, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Takeshima T, Inoue K, Eto Y, Kim SU. Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons. *Hum Cell* 14: 7-15, 2001

27) Vanderluit JL, Mcphail LT, Fernandes KJ, McBride CB, Huguenot C, Roy S, Robertson GS, Nicholson DW, Tetzlaff W. Caspase-3 is activated following axotomy of neonatal facial motoneurons and caspase-3 gene deletion delays axotomy-induced cell death in rodents. *Eur J Neurosci* 12: 3469-3480, 2000

28) Mattsson P, Aldskogius H, Svensson M. Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J Neurosurg* 90: 760-765, 1999

29) Mattsson P, Janson AM, Aldskogius H, Svensson M. Nimodipine promotes regeneration and functional recovery after intracranial facial nerve crush. *J Comp Neurol* 437: 106-117, 2001

30) Kiyama H, Seo S, Namikawa K. [Molecular mechanism of neuronal survival and regeneration after injury]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45: 1309-1317, 2000

31) Horvat A, Schwaiger F, Hager G, Brocker F, Streif R, Knyazev P, Ullrich A, Kreutzberg GW. A novel role for protein tyrosine phosphatase shp1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. *J Neurosci* 21: 865-874, 2001

32) Nakajima K, Kohsaka S. [Glial cells-derived neurotrophic factors]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 42: 489-495, 1997

33) Kalla R, Liu Z, Xu S, Koppius A, Imai Y, Kloss CU, Kohsaka S, Gschwendtner A, Moller JC, Werner A, Raivich G. Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol* 436: 182-201, 2001

34) Angelov DN, Krebs C, Walther M, Martinez-Portillo FJ, Gunkel A, Lay CH, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Stennert E,

- Neiss WF. Altered expression of immune-related antigens by neuronophages does not improve neuronal survival after severe lesion of the facial nerve in rats. *Glia* 24: 155-171, 1998
- 35) Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M. Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia* 23: 181-190, 1998
- 36) Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Schwartz M. Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve. *Glia* 24: 329-337, 1998
- 37) Jander S, Lausberg F, Stoll G. Differential recruitment of CD8+ macrophages during Wallerian degeneration in the peripheral and central nervous system. *Brain Pathol* 11: 27-38, 2001
- 38) Goldberg JL, Barres BA. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci* 23: 579-612, 2000
- 39) Russell FD, Koishi K, Jiang Y, McLennan IS. Anterograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in rat hypoglossal nerve. *Neuroscience* 97: 575-580, 2000
- 40) Hammarberg H, Piehl F, Cullheim S, Fjell J, Hokfelt T, Fried K. GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuroreport* 7: 857-860, 1996
- 41) Baumgartner BJ, Shine HD. Targeted transduction of CNS neurons with adenoviral vectors carrying neurotrophic factor genes confers neuroprotection that exceeds the transduced population. *J Neurosci* 17: 6504-6511, 1997
- 42) Hanson MG, Jr., Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 18: 7361-7371, 1998
- 43) Barger SW. Complex influence of the L-type calcium-channel agonist BayK8644 (+/-) on N-methyl-D-aspartate responses and neuronal survival. *Neuroscience* 89: 101-108, 1999
- 44) Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA. Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 23: 285-295, 1999
- 45) David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931-933, 1981
- 46) Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 273: 510-513, 1996
- 47) Stichel CC, Lips K, Wunderlich G, Muller HW. Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts. *Exp Neurol* 140: 21-36, 1996
- 48) Chaisuksunt V, Zhang Y, Anderson PN, Campbell G, Vaudano E, Schachner M, Lieberman AR. Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth-associated protein-43. *Neuroscience* 100: 87-108, 2000

Degeneration and Preservation of the Rat Facial Nucleus Following Axotomy in the Brainstem Tsuyoshi Mashitani, Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. J. Med Soc., **111**, 348 — 361 (2002)

Key words facial nerve, axotomy, brainstem, transplantation, neurotrophic factor

Abstract

Damage to facial nerve function is one of the major clinical problems for neurosurgical patients. Following axotomy of facial nerves, the degree and ratio of neuronal cell death in the facial nuclei is a crucial parameter that influences axonal regeneration. The more proximal the facial nerve is injured, the less chance the motoneurons survive. The aim of this study is to establish an adult rat model for retrograde degeneration of the facial nucleus after axotomy at various lesions, in order to investigate the mechanism of retrograde degeneration and the responses of the surrounding glial cells. In addition, the neuroprotective effects of autografted peripheral nerve tissues are also investigated. The models include a control injury model; the brainstem is injured without transection of the facial nerve tract, a distal injury model; the facial nerve is cut at the stylomastoid foramen, a proximal injury model; the facial nerve is avulsed at the stylomastoid foramen resulting in more proximal transection than the distal injury model, a brainstem injury model; the genu of the facial nerve tract in the brainstem is stereotactically transected, and a transplanted model; a PNS autograft is transplanted to the injury site of the brainstem injury model. Immunohistochemically, GFAP positive reactive astrocytes can be seen in all models, but ED1 positive reactive microglia and macrophages can only be observed under conditions of neuronal degeneration, in the proximal injury and brainstem injury groups. On day 7, compared with the contralateral side, the survival ratio of motoneurons of the facial nuclei is $105.8 \pm 3.8\%$ in the control injury group, $102.4 \pm 5.2\%$ in the distal injury group, $94.6 \pm 7.4\%$ in the proximal injury group, $30.9 \pm 8.3\%$ in the brainstem injury group, $43.7 \pm 6.2\%$ in the transplanted group. On day 28, the survival ratio is $96.4 \pm 5.0\%$ in the control injury group, $90.2 \pm 3.0\%$ in the distal injury group, $49.7 \pm 6.3\%$ in the proximal injury group, $2.3 \pm 1.2\%$ in the brainstem injury group, $20.4 \pm 5.1\%$ in the transplanted group. These results suggest that the brainstem lesion model used in this study causes a massive neuronal cell death and that it is useful to study the mechanism of retrograde neuronal degeneration. Additionally, the transplantation of the PNS autograft has clear neuroprotective effects against retrograde degeneration.